(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 11 月 29 日 (29.11.2012)

W 画P O | P C T

(10) 国際公開番号
WO 2012/160678 A1

(51) 国際特許分類：
C07K 16/28 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP20 11/062007

(22) 国際出願日： 201 1 年 5 月 25 日 (25.05.201 1)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について):国立大学法人 琉球大学 (University of the Ryukyus) [JP/JP]; 〒9030213 沖縄県中頭郡西原町字千原 1 番地 Okinawa (JP). 株式会社琉球免疫研究所 (Ryukyu Immunology Corporation) [JP/JP]; 〒9042234 沖縄県うるま市字州崎 5 番地 1 Okinawa (JP).

(72) 発明者 ;および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ):田中 勇悦 (TANAKA, Yuetsu) [JP/JP]; 〒9030215 沖縄県中頭郡西原町字上原２０７番地 国立大学法人琉球大学大学院医学研究科内 Okinawa (JP).

(74) 代理人 :秋山 敦 , 外 (AKIYAMA, Atsushi et al.) ;〒1050001 東京都港区虎ノ門３丁目５番 1 号虎ノ門３７森ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, YL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て：

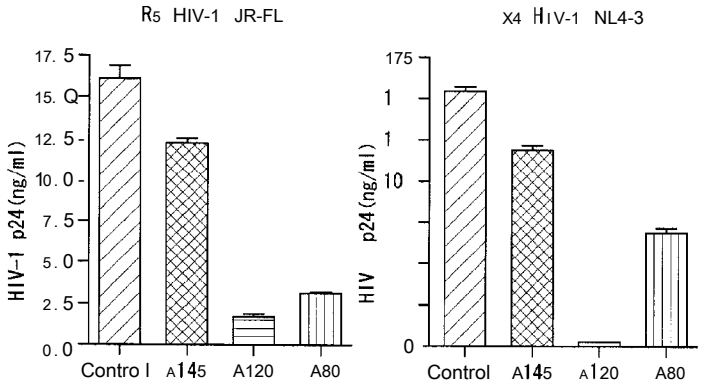
不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

[続葉有]

(54) Title: SUBSTANCE FOR INHIBITING INFECTION BY HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS

(54) 発明の名称 :ヒト免疫不全ウィルス感染阻害物質

[図3]



(57) Abstract: [Problem] To provide a substance for blocking CXCR4 functioning as a coreceptor and stopping infection by X4 virus, whilst also providing a substance for inhibiting infection by human immunodeficiency virus which is effective not just against X4 virus but also against R5 virus, and thus effectively stopping the onset of human immunodeficiency syndromes. [Solution] An inhibitory substance which inhibits the infection of a target cell by human immunodeficiency virus. This inhibitory substance is a monoclonal antibody having binding specincity for an α-chemokine receptor appearing in a target cell. This α-chemokine receptor is CXCR4, and the monoclonal antibody which is an inhibitory substance is an anti-CXCR4 monoclonal antibody.

(57) 要約：【課題】補助受容体として機能する CXCR4 をブロックして X4 ウィルスの感染を阻止する物質を提供するとともに、X4 ウィルスのみならず R5 ウィルスにも有効なヒト免疫不全ウィルス感染阻害物質を提供し、ヒト免疫不全症候群の発症を有効に阻止することにある。【解決手段】ヒト免疫不全ウィルスの標的細胞への感染を阻害する阻害物質に関する。この阻害物質は、標的細胞に発現するα-ケモカイン受容体に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。このα-ケモカイン受容体は CXCR4 であり、阻害物質であるモノクローナル抗体は抗 CXCR4 モノクローナル抗体である。

WO 2012/160678 A1

添付公開書類：

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称 ：ヒト免疫不全ウィルス感染阻害物質

技術分野

[0001] 本発明は、ヒト免疫不全ウィルス感染阻害物質に関し、特に、ヒト免疫不全ウィルスの感染増殖を阻害することによりAIDS発症を防止することが可能なヒト免疫不全ウィルス感染阻害物質に関するものである。

背景技術

[0002] ヒトに感染するウィルスによって様々な感染症が引き起こされることは従来より知られており、この感染症の撲滅は世界平和を実現するための世界共通課題の一つである。

このようなウィルス感染症の一種である後天性免疫不全症候群 (エイズ ;AIDS) は、ヒト免疫不全ウィルス (以下、 「HIVウィルス」と記す) の感染によるものである。

これは、ヘルパーT細胞が破壊された結果、免疫能力が極端に低下することにより、他の病原体に日和見感染することが原因で罹患する疾病である。

なお、HIVには、ウィルスの起源によりHIV-1とHIV-2の2つのタイプが存在する。

[0003] HIV-1ウィルスが増殖するとともに細胞死を誘導する細胞が、主としてCD4陽性のTリンパ球やマクロファージであることから、このHIV-1ウィルスの主要な受容体がCD4分子であることは、従来より知られている。

これは、CD4分子の対するモノクローナル抗体が感染を阻害することや、CD4を発現していないヒト上皮系細胞にCD4を発現させることにより感染が成立することなどから検証されている。

しかし、CD4を強制発現させても、完全に感染が成立するわけではないことから、CD4は主要な受容体ではあっても、これのみでは完全に感染が起こるわけではなく、何らかの要因が必要であることがわかっていた。

[0004] このような状況下、HIV-1ウィルスの感染においては、受容体としてのCD4

必要であるとともに、補助受容体として、GXGR4とGGR5が関与していることがわかった。

GXGR4及びGGR5は、白血球遊走活性を有するたんぱく質であるケモカイン（chemokine）の受容体である。

このケモカイン受容体は、Gタンパク質共役型受容体（GPGR）であり、一般的には、ホモオリゴマー若しくはヘテロオリゴマーとして細胞表面に存在する。

[0005] HIV-1ウィルスは、自己のエンベロープスパイクであるgp120を、感染標的細胞表面の受容体GD4に結合させることにより感染標的細胞表面に連結する。

次いで、gp120の立体構造を変化させることにより、gp120を補助受容体（GXGR4又は／及びGGR5）に結合させる。

そして、この状態で、gp41のN末端に存在するフユージョンペプチドを細胞の脂質二重膜に突き刺す。

次いで、gp41の2個のひーへリックス構造がお互いに反応することにより、ヘアピン構造がとられ、HIV-1ウィルスは細胞表面に近接していく。

最終的には、膜融合が起こり、HIV-1ウィルスは自身のゲノムを細胞内に侵入させて感染が実行される。

[0006] 一方、HIV-1ウィルスには、GD4陽性の抹消血リンパ球とマクロファージで増殖可能なウィルス（マクロファージ指向性HIV-1ウィルス）と、GD4陽性のTリンパ球とT細胞株で増殖可能なウィルス（T細胞株指向性HIV-1ウィルス）とが存在している。

そして、マクロファージ指向性HIV-1ウィルスは、GGR5分子を補助受容体として必要とすることが検証されているとともに、T細胞株指向性HIV-1ウィルスは、GXGR4を補助受容体として必要とすることが検証されている。

なお、このような補助受容体の利用能力により、HIV-1ウィルスを分類することもあり、補助受容体としてGGR5を利用するHIV-1ウイルスはR5ウィルスと命名されており、補助受容体としてGXGR4を利用するHIV-1ウィルスはX4ウイルスと命名されている。

また、補助受容体としてGGR5及びGXGR4の双方を利用するものは、R5X4ウイルスと命名されている。

[0007] このように、HIV-1ウィルスは、感染のために補助受容体を使用するのであるから、これらの補助受容体にHIV-1ウィルスが結合する前に、補助受容体をブロックすることにより、HIV-1ウィルスの感染を阻害することができることが示唆される。

実際、R5ウィルスの感染は、GGR5の正常リガンドのケモカインであるMIP-1ひ、MIP_1β、RANTES等で阻害され、X4ウィルスの感染は、GXGR4の正常リガンドのケモカインであるSDF-1ひで阻害される。

以上の知見により、GGR5及び／又はGXGR4へのHIV-1ウィルスの結合を阻害して、HIV-1ウィルス感染を阻害する技術が開発されている（例えば、特許文献1及び特許文献2参照）。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開２００６＿１８８４４５号公報

特許文献2：特表２００６—５０３８４９号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] このような知見の元、多剤併用療法に変わる新たな治療薬として、ケモカイン受容体阻害剤が開発されている。

例えば、GGR5阻害剤としては、「Maraviroc」や「Vicriviroc」が例示される。

しかし、GXGR4阻害剤として開発された「AMD3100」は、一部の患者に重篤な副作用が認められたことからHIV-1ウィルス感染阻害剤としての臨床は打ち切られている（他の疾病用の薬剤としては使用されている）。

[0010] このような状況下、感染に補助受容体としてGXGR4を利用するX4ウィルスに対して有効に感染を阻止する物質の開発が早急に望まれており、また、更に

、GGR5及びGXGR4双方への結合を阻害することが可能であり、感染に補助受容体としてGGR5を利用するR5ウィルスにも併せて効果を有する物質の開発が望まれていた。

[0011] このような状況下、発明者らは鋭意研究を重ね、ある種のGXGケモカイン受容体抗体を(ひ-ケモカイン受容体抗体)を用いることによって、X4ウィルスの感染のみならず、R5ウィルスの感染もまた阻害することが可能であるという知見を得た。

つまり、GXGケモカイン受容体抗体であるAnti_GXGR4 ECL 3抗体 (以下、単に 「A80抗体」と記載)、Anti-CXCR4 ECL 2抗体であるMAB171抗体, MAB172抗体, MAB173抗体が、GXGR4をブロックしてX4ウィルスの結合を阻害するだけではなく、これらの抗体がR5ウィルスの感染もまた阻害するという知見を得たものである。

また、特に、GXGケモカイン受容体抗体であるAnti_GXGR4 ECL 1&2抗体 (以下、単に 「A120抗体」と記載)が、GXGR4をブロックしてX4ウィルスの結合を顕著に阻害するだけではなく、このA120抗体がR5ウィルスの感染もまた顕著に阻害するという知見を同時に得たものである。

[0012] 本発明の目的は、上記課題に鑑み、補助受容体として機能するGXGR4をブロックしてX4ウィルスの感染を阻止する物質を提供するとともに、X4ウィルスのみならずR5ウィルスにも有効なヒト免疫不全ウィルス感染阻害物質を提供し、ヒト免疫不全症候群の発症を有効に阻止することにある。

課題を解決するための手段

[0013] 上記課題は、本発明によれば、ヒト免疫不全ウィルスの標的細胞への感染を阻害する阻害物質を提供することにより解決される。

この阻害物質は、前記標的細胞に発現するひ-ケモカイン受容体に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。

また、前記ひ-ケモカイン受容体はGXGR4であり、前記阻害物質である前記モノクローナル抗体は抗GXGR4モノクローナル抗体である。

なお、このひ-ケモカイン受容体GXGR4は、ひ-ケモカイン (GXGケモカイン

) であるSDF-1ひ/β、トTAGの受容体である。

[001 4] 更に、前記阻害物質は、前記ヒト免疫不全ウィルスのうち、前記標的細胞に発現するβ-ケモカイン受容体GGR5を補助受容体として利用するHIV-1 R5ウィルス、前記標的細胞に発現するひ-ケモカイン受容体GXGR4を補助受容体として利用するHIV-1 X4ウィルス、前記標的細胞に発現するβ-ケモカイン受容体GGR5及びひ-ケモカイン受容体GXGR4の双方を補助受容体として利用するHIV-1 R5X4ウィルス、全ての感染を阻害する。

[001 5] そして、前記ひ-ケモカイン受容体はGXGR4であるとともに、前記阻害物質である前記モノクローナル抗体は抗GXGR4モノクローナル抗体であり、前記抗GXGR4モノクローナル抗体は、前記標的細胞表面より外側へ突出している前記GXGR4の複数のループドメインのうち、少なくとも第1ループドメイン及び第2ループドメインの一方を有する三次元エピトープを認識する抗体、若しくは、第3ループドメインを有する三次元エピトープを認識する抗体である。

なお、少なくとも第1ループドメイン及び第2ループドメインの一方を有する三次元エピトープを認識する抗体とは、第1ループドメイン又は第2ループドメインの一方を認識する抗体、第1ループドメイン及び第2ループドメィン双方を認識する抗体を含み、このGXGR4の複数のループドメインうち、第1ループドメイン及び第2ループドメイン双方を有する三次元エピトープを認識する抗体が、本明細書中の「A120抗体」(Anti-GXGR4 ECL 1&2抗体)若しくは12G5抗体であり、第3ループドメインを有する三次元エピトープを認識する抗体が、本明細書中の「A80抗体」(Anti-GXGR4 ECL 3抗体)である。

また、第2ループドメインを有する三次元エピトープを認識する抗体は、MAB171抗体，MAB172抗体，MAB173抗体である。

[001 6] また、前記ひ-ケモカイン受容体はGXGR4であるとともに、前記阻害物質である前記モノクローナル抗体は抗GXGR4モノクローナル抗体であり、前記抗GXGR4モノクローナル抗体は、前記標的細胞表面より外側へ突出している前記GXGR4の複数のループドメインのうち、少なくとも第1ループドメイン及び第2

ループドメインの一方を有する三次元エピトープを認識する抗体であり、前記抗GXGR4モノクローナル抗体は、前記GXGR4に結合することにより、前記標的細胞に発現するひ-ケモカイン受容体GXGR4を補助受容体として利用するHIV-1 X4ウィルスの前記GXGR4への結合を阻害することにより、前記HIV-1 X4ウィルスの感染を阻止するとともに、前記抗GXGR4モノクローナル抗体の前記GXGR4への結合により誘起されるβ-ケモカインにより、前記標的細胞に発現するβ-ケモカイン受容体GGR5をダウンモデュレーションさせ、結果としてこのGGR5を補助受容体として利用するHIV-1 R5ウィルスの感染を阻止する。

なお、前述のとおり、少なくとも第1ループドメイン及び第2ループドメインの一方を有する三次元エピトープを認識する抗体とは、第1ループドメイン又は第2ループドメインの一方を認識する抗体、第1ループドメイン及び第2ループドメイン双方を認識する抗体を含む。

つまり、A120抗体を筆頭に、前段落に例示した各抗体は、HIV-1 X4ウィルス及びHIV-1 R5ウィルス双方の感染を有効に阻止する。

発明の効果

[0017] 本発明に係るヒト免疫不全ウィルス感染阻害物質は、HIV-1ウィルスの補助受容体であるGXGR4をブロックすることにより、X4ウィルスの感染を有効に阻止できる。

また、ヒト免疫不全ウィルス感染阻害物質の中でも、標的細胞表面より外側へ突出しているGXGR4の複数のループドメインのうち、第1ループドメイン及び第2ループドメインを有する三次元エピトープを認識する抗体であるA120抗体は、GXGR4に結合することによりダウンモデュレーションを誘起して、R5ウィルスの感染も同時に阻止することができる。

このように、本発明に係るヒト免疫不全ウィルス感染阻害物質は、X4ウイルスのみならず、R5ウィルスの感染も同時に阻止することができる。

よって、特に、X4ウィルス及びR5ウィルスの感染によるヒト免疫不全症候群の発症を有効に防止することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]X4ウィルスの感染についての模式図である。

[図2] PBMG（抹消血単核球）の活性化とHIV-1の感染スキームを示す流れ図である。

[図3] 活性化PBMG（一次）へのR5ウィルス及びX4ウィルスの感染に対する抗GXGR4モノクローナル抗体の効果を示すグラフである。

[図4] A120モノクローナル抗体のX4ウィルス及びR5 ウィルス感染抑制効果を示すグラフである。

[図5] 関連性のない複数の ドナー由来の活性化PBMGに対するA120モノクローナル抗体のHIV-1生成抑制効果を示すグラフである。

[図6] 活性化PBMGでのR5ウィルス及びX4ウィルス抑制効果におけるA120モノクローナル抗体の濃度依存性を示すグラフである。

[図7] HIV-1産生細胞株及びHTLV-1産生細胞株に対するA120モノクローナル抗体の影響を示すグラフである。

[図8] 活性化PBMGにおけるA120モノクローナル抗体によるGGR5結合性β-ケモカイン産生の増加を示すグラフである。

[図9] A120モノクローナル抗体添加によるGGR5結合性β—ケモカイン産生の誘導とGGR発現のダウンモデュレーションを示すグラフである。

[図10] A120モノクローナル抗体添加によるGGR5結合性β—ケモカイン産生の誘導とGGR発現のダウンモデュレーションを示すヒス トグラムである。

[図11] A120モノクローナル抗体添加によるGGR5結合性β—ケモカイン産生の誘導とGGR発現のダウンモデュレーションを示すヒス トグラムである。

[図12] T細胞と単核球におけるA120モノクローナル抗体の刺激によるβ-ケモカイン産生を示すグラフである。

[図13] 様々なHIV-1株種に対するA120モノクローナル抗体の感染抑制効果を示すグラフである。

[図14] 活性化PBMG（一次）へのR5ウィルス及びX4ウィルスの感染に対する抗GXGR4モノクローナル抗体の効果を示すグラフである。

[図15] 活性化PBMGにおけるA120モノクローナル抗体及びMAB173モノクロ_ ナ

ル抗体によるGGR5結合性β—ケモカイン産生の増加を示すグラフである。

[図16]A120モノクローナル抗体のX4ウィルス及びR5ウィルス感染阻害メカニズムを示す模式図である。

発明を実施するための形態

[0019] 以下、本発明の一実施形態について説明する。

なお、以下に説明する部材、配置等は、本発明を限定するものではなく、本発明の趣旨に沿って各種改変することができることは勿論である。

[0020] 以下に、実験系及び結果について説明する。

図1に、X4ウィルスの感染についての模式図を示す。

上述したように、X4ウィルスが細胞に感染する際には、そのエンベロープスパイクであるgp120を細胞表面の受容体GD4に結合させることが必要であるとともに、そのgp120の立体構造を変化させることにより、gp120を補助受容体であるGXGR4に結合させることが必要である。

補助受容体として作用するGXGR4は、ケモカイン受容体であるが、このGXGR4は、細胞表面に、複数のループドメインを突出させた状態で存在することが知られている。

[0021] 発明者らは、この中で、第3ループドメインを有する三次元エピトープを認識する抗体であるA80（クローン）、第3ループドメインを有する三次元エピトープを認識する抗体であるMAB171, MAB172, MAB173が特異的性質を有することを見出し、これらのモノクローナル抗体とGXGR4との連結体が、X4ウィルスの活性化PBMG（末梢血単核球）への感染を阻害するのみではなく、R5ウイルスの活性化PBMGへの感染をもまた阻害することを確認した（in vitro）。

また、この中で特に、第1ループドメイン及び第2ループドメインを有する三次元エピトープを認識する抗体であるA120（クローン）が特異的性質を顕著に有することを見出し、このA120とGXGR4との連結体が、X4ウィルスの活性化PBMG（末梢血単核球）への感染を阻害するのみではなく、R5ウィルスの活性化PBMGへの感染をもまた大きく阻害することを確認した（in vitro）。

以下、その検証を示す。

[0022] 1．使用試薬及び方法等

（1）培地

RPMI 1640 培地は1g阳3．六1づi北．Inc. St. Lou is, M0) に、10%ウシ胎児血清（FGS) 100U/ml ペニシリン、100〃g/ml ストレプトマイシンを加えて調整した (以下、単に「RPMI培地」と記す）。

抗ヒhCD3 (clone 0KT-3) 及び抗GD28 (clone 28. 2) は、それぞれAmer ican Type Culture Gollect ion (Rockv ille, W10) 及びBi0 1 6g6 nd は3 n0 16g0, GA) のものである。

[0023] （2）抗体等

抗GXGR4モノクローナル抗体のクローンは、当研究室のWKAラットを免疫して作成した。

A145クローン (lgG1）、A120クローン (lgG2b) 、A80 クローン (lgG1） も同様である。

これらの構造及び作成方法の詳細は、文献 1 「Uniqe monoc lona l ant ibody recogn izing the third extrace llular loop of CXCR4 induces lymphocyte aggglut inat ion and enhances human immunodef iciency virus type 1-med iated syncyt ium format ion and product iVe infect ionj Journa l of virology 2001 ;75 (23) : 11534-1 1543 Prepub lished on 2001/1 1/02 as DOI 10. 1128/ JVI. 75. 23. 11534-1 1543. 2001 , Tanaka R, Yosh ida A, Murakami T, et aに参照のこと。

また、これらのモノクローナル抗体によって認識されるエピトープの解析も、上記文献 1参照のこと。

なお、12G5モノクローナル抗体、MAB171モノクローナル抗体、MAB172モノクローナル抗体、MAB173モノクローナル抗体は、R&Dより購入した。

[0024] 使用したラットlgGアイソタイプコントロールは、lgG2b ant i_HTLV_1 gp46 (LAT-27 クローン)とlgG1 ant i-HCV enve lope2 (Mo- 8クローン)である。

これについての詳細は、文献 2 「New monoc lona l ant ibod ies aga inst a r ecomb inant second enve lope prote in of Hepat it is C virusj Microb iol Im

munol 1988;42(12):875-877. Prepublished on 1999/02/26 as DOI, Inudoh M, Kato N, Tanaka Y参照のこと。

ラット抗ヒトCCR5モノクローナル抗体は、T312 rat IgG1クローン由来のものであり、詳細は、上記文献1参照のこと。

[0025] これらのモノクローナル抗体は、GB. 17-SGI Dマウス腹水の硫酸アンモニウム沈殿、Superdex G200 (GE)でのゲルろ過を行うことにより精製した。

これらの抗体の調整は、polymixin B columnを通すことにより行い、リポ多糖(LPS)の混入は、LAL法により確認し、リポ多糖(LPS)の濃度は検出下限界外であることが確認された。

[0026] IgGの一部は、既存の標識キットを取扱説明書に沿って使用し、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 647 (InVitrogen)、Gy5 (GE)、horseradishperoxidaselzよって標識した (Dojin, Kumamoto, Japan)。

FITC(フルオロセインイソチアネート)標識若しくはPE(フィコエリトリン)標識抗ヒトGD4、GD8、GD14、GD19モノクローナル抗体は、Beckman-GoiHter若しくはBioLegendより購入した。

[0027] 使用した抗HIV-1 P24モノクローナル抗体は、発明者の研究室で作成した。

詳細は、文献3「Suppression of CCR5-tropic HIV type 1 infection by 0X40 stimulation via enhanced production of beta_chemokines」AIDS research and human retroviruses 2010;26(10):1147-1154 Prepublished on 2010/09/22 as DOI 10.1089/aid.2010.0043, Tanaka R, Takahashi Y, Kodama A, Saito M, Ansari AA, Tanaka Y参照のこと。

[0028] 抗ヒトGD4、GD8、GD14、GD19モノクローナル抗体を抱合したマグネットビーズは、Dynalandより購入し、取扱説明書に沿って使用した。

12G5を含有する低エンドトキシンマウス抗GXGR4モノクローナル抗体は、BioLegend and R&Dより購入した。

[0029] (3) HIV調整

HIV-1 (JR_FL)、HIV-1 (JR_GSF)、HIV-1 (NL4-3)は、リン酸カルシウム法により、HIV-1感染性プラスミドDNAを有する293T細胞のトランスフエクシヨン

により作成した。

詳細は、文献4「Induct ion of protect iVe immune responses aga inst R5 human immunodef iciency virus type 1(HIV-1) infect ion in hu-PBL-SCI D mice by intrasp lenic immunizat ion with HIV-1-pu lsed dendr it ic cells:p oss ible invo lvement of nove l factor of human CD4(+) T-ce 11 originj Jou rna l of Virology 2003;77(16):871 9-8728 Prepub lished on 2003/07/30 as D0 l, Yosh ida A, Tanaka R, Murakami T et aに参照のこと。

[0030] 遺伝子導入細胞は、RPMは音地にて4日間培養した (in vitro) 。上清を回収し、ウィルス力価を決定した。詳細は、上記文献4参照。

HIV-1(1||B)は、Molt-4/ 111 cell lineで作成し、培養上清は回収して使用した。

その他のHIV-1は、HIV subtype infect iVity pane l PRD320 (BB l Diagnost ics, West Br idgewater, MA, USA)から得たものである。

HIV-1は、使用するまで、_80 °Cで保存した。

[0031] (4) PBMC(末梢血単核球)の活性化とHIV-1の感染

健康なドナーから採取されたPBMG(末梢血単核球)を活性化した。詳細は、上記文献3参照のこと。

簡単なスキームを図2に示す。

[0032] 以下、簡略に説明する。

密度勾配遠心 (HistoPAQUE-1 077 Sigma-A ldrich) によって得られたPBMGをRPMは音地に懸濁させ (濃度 :2 x 10^6cells/ml) 、0KT3 (濃度 :5μg/ml) でプレコートした1ml/we llのプレート (24wel lにBD) に分注して、0.1パg/mlの抗GD28モノクローナル抗体の存在下24時間培養した (5%炭酸ガス雰囲気下) 。

[0033] 活性化PBMGを回収して一度洗浄し、HIV-1クローン (感染多重度0.005〜0.01m. 0.i.) 又は一次分離物 (細胞数2 x 10^6に対してp24が10ng) を感染させた (2時間) 。

次いで三回洗浄し、20Uml IL-2を含有するRPMは音地に再度懸濁させ (濃度

:1x 10^6cells/ml ）、0.5ml /well のプレート (48well にBD) に分注して、様々な濃度の抗GXGR4モノクローナル抗体の存在又は非存在下及びコントロールを培養した。

[0034] 選択実験としては、抗GD3/GD28 抗体 (1day) を感作した活性化PBMGを、20U/ml IL-2 を含有するRPMは音地にて、A120モノクローナル抗体の存在下又は非存在下、24時間培養し (濃度 :1x 10^6cells/ml ）、β-ケモカインの量をELISAにより定量した。

HIV-1 の増殖は、培養液上清中に生成されたHIV-1 core p24 を、抗HIV-1 P24モノクローナル抗体との結合を利用したキヤプチャーELISAにより定量ことにより同定した。なお、スタンダードとして組換え型HIV-1 P24 蛋白 (Bio Academia, Canada) を使用した。

ヒトβ-ケモカインに適用するELISAキットは、Biosource (Gamer illo) 若しくはBiolegend より購入した。

[0035] （5）フローサイトメトリー (Flow Cytometry :以下、単に「FGM」と記す）

生細胞のFGM分析についての詳細は、上記文献3参照のこと。

以下、簡略に説明する。

分析を行う細胞は、2mg/ml のヒトIgGでFc受容体をブロックし (氷冷15分）、これらの細胞の一定量を、モノクローナル抗体と結合した蛍光染料 (予め決定した濃度）で染色した (氷冷30分）。

細胞は、FAGS緩衝液 (2%FGSと0.1%アジ化ナトリウムを含むPBS) で洗浄して、FAGS緩衝液中の1% パラホルムアルデヒド (以下、単に「PFA」と記す）で固定し、FAGS Galibur を使用して分析した。

[0036] 得た分析データは、Cell Quest softwear (BD) で解析した。

HIV-1 感染細胞を検出するために、細胞を4%のPFA を含むPBSで固定し (室温5分）、0.1%のサポニンを含むFAGS緩衝液で洗浄した。

これらの細胞は、2mg/ml のヒトIgGでFc受容体をブロックし (氷冷15分）、これらの細胞の一定量を、抗HIV-1 p24 モノクローナル抗体 (クローン2G2) と結合したAlexa Fluor 488 で染色した (氷冷30分）。

細胞は、FAGS緩衝液で洗浄し、p24+細胞の細胞頻度分布と絶対数を、細胞計測キット (BD) を使用してFGMによりマニュアルに沿って計測した。

[0037] （６）統計解析

データは、Prism software (Graph Pad) を使用し、スチューデントt検定により有意差の有無を解析した。

[0038] ２．実験及び結果

（１）活性化PBMG（一次）へのR5ウィルス及びX4ウィルスの感染に対する抗GXGR4モノクローナル抗体の効果

研究室で調整した10μg/ml抗GXGR4モノクローナル抗体（A145クローン、A120クローンA80クローン）の存在下及び非存在下において、抗GD3/GD28抗体で活性化したPBMG（初代培養）へのR5ウィルス及びX4ウィルス（JR-FL株及びNL4-3株）の感染性を分析した。

これらのPBMGは、低感染多重度（0.005～0.01）でHIV-1にプレ感染させており、検証するモノクローナル抗体の存在下又は非存在下で培養を行った。

[0039] その結果を図３に示す。

図３に示すように、A120モノクローナル抗体及びA80モノクローナル抗体は、R5ウィルス及びX4ウィルス双方の生成（HIV-1 P24）を顕著に抑制したが、A145モノクローナル抗体は、大きな増殖抑制効果は認められなかった。

[0040] （２）A120モノクローナル抗体の更なる評価

上記実験において、A120モノクローナル抗体のHIV-1抑制効果が、その他のモノクローナル抗体の中で最も高かったので、A120モノクローナル抗体のウィルス感染抑制効果の更なる評価を行った。

HIV-1株として、R5 HIV-1 JR-FL、R5 HIV-1 JR-GSF、X4 HIV-1 NL4-3、X4 HIV-1 IIIBを使用した。

[0041] その結果を図４に示す。

図４に示すように、R5 HIV-1 JR-FL、R5 HIV-1 JR-GSF、X4 HIV-1 NL4-3、X4 HIV-1 IIIB全ての株において、A120モノクローナル抗体がHIV_1生成抑制効果を示すことが認められた。

[0042] （３）関連性のない複数のドナー由来の活性化PBMGに対するA120モノクローナル抗体のHIV-1 生成抑制効果

関連性のないドナー由来の活性化PBMGに対するA120モノクローナル抗体のR5 HIV-1 JR-FL 及び X4 HIV-1 NL4-3 生成及び増殖抑制効果を検証した。

6例のドナーから採取したPBMGは、固定化した0KT-3 と溶液状の抗GD28モノクローナル抗体で予め活性化し、R5 HIV-1 JR-FL 及び X4 HIV-1 NL4-3 に感染させた (感染多重度0.01m.0.i) 。

細胞は洗浄後、A120モノクローナル抗体及びコントロール（rat isotype) とともに4 日間培養した。

ウィルスの増殖は、p24 濃度、及び１．（５）において記載したFGMによる感染細胞の頻度分布により評価した。

[0043] その結果を図5 に示す。

図5 に示すように、R5 HIV-1 JR-FL 及び X4 HIV-1 NL4-3 生成及び増殖抑制効果には確かにドナー毎のばらつきがあるが、どのケースにおいても、A120モノクローナル抗体を添加することにより、顕著な抑制効果を示すことがわかる。

更に、図5 （ｂ）によると、どのケースにおいても、感染細胞の頻度分布が減少していることから、A120モノクローナル抗体を感作させると、ウィルスの細胞伝播が抑制されることがわかる。

このように、R5ウィルス及びX4ウィルス双方の感染及び増殖を抑制する抗GXGR4モノクローナル抗体 （A120モノクローナル抗体）は、現在知られている限りにおいては初めての知見である。

[0044] （４）活性化PBMGでのR5ウィルス及びX4ウィルス抑制効果におけるA120モノクローナル抗体の濃度依存性

X4ウィルスと比較してR5ウィルスの抑制効果に違いがあるのか否かを検証した。

X4ウィルス及びR5ウィルスに感染した活性化PBMGを各濃度のA120モノクローナル抗体濃度存在下で4 日間培養した。

培養上清におけるHIV-1感染は、p24 ELISAにより評価した。

[0045] その結果を図6に示す。

図6に示すように、最大の抑制効果を顕すA120モノクローナル抗体濃度は、R5ウィルスでは5〃g/ml以上であり、X4ウィルスでは0.6〃g/ml以上であった。

しかし、図5のグラフの形状が示す通り、A120モノクローナル抗体によるR5ウィルス及びX4ウイルス抑制のメカニズムは異なることが示唆された。

[0046] (5) HIV-1産生細胞株及びHTLV-1産生細胞株に対するA120モノクローナル抗体の影響

上記のような結果が得られているが、A120モノクローナル抗体の添加によるウィルスの感染及び増殖抑制は、A120モノクローナル抗体に混入していた非特異的な阻害物質の存在により二次的に引き起こされたものではない。

これを示すために、同濃度及び同量のA120モノクローナル抗体をHIV-1産生細胞株Moは-4/IIIB及びHTLV-1産生細胞株MT-2に添加して検証した。

HIV-1産生細胞株Mo 11-4/ 1IIB及びHTLV-1産生細胞株MT-2は、A120モノクローナル抗体 (10ug/ml) 又はコントロール存在下で1日間培養した。

培養上清におけるHIV-1 p24、HTLV-1 p24は ELISAにより評価した。

[0047] その結果を図7に示す。

図7に示すように、A120モノクローナル抗体を添加したことによる影響は認められなかった。

[0048] (6) 活性化PBMGにおけるA120モノクローナル抗体によるGGR5結合性β—ケモカイン産生の増加

ヒトMIP-1ひ、ヒトMIP_1β、ヒトRANTESに対する中和モノクローナル抗体を使用し、これらの中和モノクローナル抗体がR5ウィルスの感染及び増殖に対するA120モノクローナル抗体の効果を逆転させるか否かを検討した。

6例のドナーから採取したPBMGは、固定化した0KT-3と溶液状の抗GD28モノクローナル抗体で予め活性化し、洗浄後、A120モノクローナル抗体及びコントロール (rat isotype) で1日間感作した。

培養上清におけるβ-ケモカインは ELISAにより評価した。

[0049] その結果を図8に示す。

図8に示す通り、A120モノクローナル抗体を媒介したR5ウィルス抑制効果は、抗MIP-1αモノクローナル抗体及び抗MIP-1βモノクローナル抗体の添加により逆転したが、抗RANTESモノクローナル抗体の添加によっては逆転しなかった。

[0050] (7) A120モノクローナル抗体添加によるGGR5結合性β—ケモカイン産生の誘導とGGR発現のダウンモデュレーション

A120モノクローナル抗体とGXGR4の結合によって、MIP-1α、MIP_1β、RANTESが生成するのか否かを確認するため、1日A120モノクローナル抗体を感作した培養液の上清中のケモカイン濃度を測定した。

[0051] その結果を図9乃至図11に示す。

図9に示す通り、A120モノクローナル抗体の存在下で培養した抗GD3/GD28活性化PBMGは、全てのドナーにおいて、MIP-1α及びMIP-1βの生成量を顕著に増加させた。

なお、RANTESにおいては、半数のドナーで増加が認められた。

[0052] また、図10に示す通り、A120モノクローナル抗体が存在する培地の活性化PBMGは、GGR5+細胞頻度及びGD4+T細胞の表面でのGGR5発現平均密度を顕著に低下させる。

逆に、GD4+T細胞によって発現するGXGR4の平均密度は僅かに増加する。なお、これは、同じPBMG培養においてA145モノクローナル抗体 (A120モノクローナル抗体とは交差反応を起こさない)を使用して検出した。

[0053] 更に、図11に示す通り、活性化PBMGがA120モノクローナル抗体とともにインキュベートされることにより引き起こされるGGR5発現の低下は、MIP-1αモノクローナル抗体及び抗MIP-1βモノクローナル抗体の添加により逆転する九 抗RANTESモノクローナル抗体の添加によっては逆転しない。

以上のように、これらの結果により、抗GD3/GD28活性化PBMGをA120モノクローナル抗体とともにインキュベートすることにより、X4ウィルス及びR5ウ

ィルス双方の感染が抑制されることがわかる。これは、X4ウィルスに対してはGXGR4をブロックすることによりもたらされる作用であり、R5 ウィルスに対してはMIP-1 ひ及びMIP-1 βのようなGGR5結合性β-ケモカィンの合成によるところであると示唆される。

[0054] （8） T細胞と単核球におけるA120モノクローナル抗体の刺激によるβ-ケモカイン産生

A120モノクローナル抗体存在下での活性化PBMGのインキュベー トに伴いβ_ケモカインの合成を行う細胞を同定するために、細胞除去実験を行った。

一定分量の抗GD3/GD28活性化PBMGから、適切な系列特異的モノクローナル抗体を抱合した免疫ビーズを使用してGD1 9+B細胞、GD4+T細胞、GD8+T細胞、GD14+単核球を除去した。

除去処理を行わないもの (mock) と各々の細胞除去処理を行った活性化PBMGを10μg/ml のA120モノクローナル抗体存在下及び非存在下で培養した。

24時間後、培養液上清中のケモカインをELISAにより定量した。

[0055] その結果を図１２に示す。

図１２に示す通り、GD14+単核球を除去した場合に、β-ケモカインの合成が最も顕著に減少し、次いで、GD4+T細胞及びGD8+T細胞を除去した場合に、β-ケモカインの合成が減少する傾向があった。

しかしながら、GD19+B細胞を欠損させた場合のβ-ケモカインの合成は、最も減少しなかった。

これらの結果は、単核球とともに活性化T細胞が、A120モノクローナル抗体に応答して、β-ケモカインを分泌していたことを示唆している。

[0056] （9） 様々なHIV- 1株種に対するA120モノクローナル抗体の感染抑制効果

A120モノクローナル抗体の抑制範囲を検証した。

一定分量の抗GD3/GD28活性化PBMGを15種類の異なったHIV-1株に感染させ、10〃g/ml のA120モノクローナル抗体存在下若しくはコントロールとしてのIgGの存在下培養を行った。そして、感染5日後、上清中のp24濃度を定量した。

[0057] 結果を図１３に示す。

図１３に示す通り、A120モノクローナル抗体存在下培養したものは、10種のR5ウィルス株、3種のX4ウィルス株、2種のR5/X4両指向性ウィルス株全てにおいて一様にp24の濃度減少が認められた。

[0058] （１０）その他の抗GXGR4モノクローナル抗体の評価

12G5モノクローナル抗体、MAB171モノクローナル抗体、MAB172モノクローナル抗体、MAB173モノクローナル抗体による抑制効果を図１４及び図１５に示す。

なお、実験方法及び評価方法等は、上記「(1) 活性化PBMG (—次) へのR5ウィルス及びX4ウィルスの感染に対する抗GXGR4モノクローナル抗体の効果」の項及び「(7) A120モノクローナル抗体添加によるGGR5結合性β—ケモカイン産生の誘導とGGR発現のダウンモデュレーション」の項と同様である。

また、12G5モノクローナル抗体は、EGL1及びEGL2を有するエピトープと結合し、MAB171モノクローナル抗体、MAB172モノクローナル抗体、MAB173モノクローナル抗体は、EGL2を有するエピトープと結合する。

[0059] 図１４（a）及び図１４（b）に示すように、12G5モノクローナル抗体、MAB171モノクローナル抗体、MAB172モノクローナル抗体、MAB173モノクローナル抗体、全てにおいて、R5ウィルス及びX4ウィルスの増殖が抑制されることがわかる。

更に、図１５に示すように、MAB173モノクローナル抗体の感作によって、A120モノクローナル抗体感作時と同様に、GGR5結合性β—ケモカインであるMIP-1ひ産生が誘導されていることがわかり、GGR5受容体のダウンモデュレーションが起こっていることがわかる。

つまり、これらの結果により、EGL2を有するエピトープと結合するモノクローナル抗体もまた、X4ウィルスのみならずR5ウィルスの感染を阻害することがわかる。

[0060] 以上のように、本件においては、EGL3を有するエピトープと結合するラット抗ヒトGXGR4 A80モノクローナル抗体、EGL2を有するエピトープと結合する

マウス抗ヒトGXGR4 MB173 (MB171及びMB172) モノクローナル抗体がR5ウィルス株及びX4ウィルス株双方の活性化PBMGへの感染を阻害することがわかった。

そして、特に、EGL1及びEGL2を有するエピトープと結合するラット抗ヒトGXCR4 A120モノクローナル抗体は、R5ウィルス株及びX4ウィルス株双方の活性化PBMGへの感染を顕著に阻害することがわかった。

このメカニズムの模式図を図16に示す。

X4ウィルス株の感染抑制に関しては、A120モノクローナル抗体及び他のEGL2領域に反応する抗体は、X4ウィルスがGXGR4に結合することを直接的に妨害する。

つまり、A120モノクローナル抗体及び他のEGL2領域に反応する抗体自らがGXGR4受容体に結合して、X4ウィルスがGXGR4に結合することを阻止する。

また、R5ウィルス株の感染抑制に関しては、主として、A120モノクローナル抗体及び他のEGL2領域に反応する抗体の刺激によりGGR5結合性β-ケモカイン (特に、MIP-1β) の産生が促されることによってGGR5受容体のダウンモデュレーションが起こり、R5ウィルスが感染することが阻止される。

このように、本発明に係るGXGケモカイン受容体抗体であるA120抗体 (Anti-CXCR4 EGL 1&2抗体) 等は、X4ウィルスのみならずR5ウィルスへの感染をも阻害するものであり、今後、臨床的な利用をも期待されるものであるとともに、AIDS撲滅の一助となることが大きく期待されるものである。

請求の範囲

[請求項1] ヒト免疫不全ウィルスの標的細胞への感染を阻害する阻害物質であって、

該阻害物質は、前記標的細胞に発現するケモカイン受容体に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とするヒト免疫不全ウィルス感染阻害物質。

[請求項2] 前記ケモカイン受容体はGXGR4であり、前記阻害物質である前記モノクローナル抗体は抗GXGR4モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項１に記載のヒト免疫不全ウィルス感染阻害物質。

[請求項3] 前記阻害物質は、前記ヒト免疫不全ウィルスのうち、前記標的細胞に発現するケモカイン受容体GGR5を補助受容体として利用するHIV-1 R5ウィルス、前記標的細胞に発現するケモカイン受容体GXGR4を補助受容体として利用するHIV-1 X4ウィルス、前記標的細胞に発現するケモカイン受容体GGR5及びケモカイン受容体GXGR4の双方を補助受容体として利用するHIV-1 R5X4ウィルス、全ての感染を阻害することを特徴とする請求項１又は請求項２に記載のヒト免疫不全ウィルス感染阻害物質。

[請求項4] 前記ケモカイン受容体はGXGR4であるとともに、前記阻害物質である前記モノクローナル抗体は抗GXGR4モノクローナル抗体であり、

前記抗GXGR4モノクローナル抗体は、前記標的細胞表面より外側へ突出している前記GXGR4の複数のループドメインのうち、少なくとも第１ループドメイン及び第２ループドメインの一方を有する三次元エピトープを認識する抗体、若しくは、第３ループドメインを有する三次元エピトープを認識する抗体であることを特徴とする請求項１又は請求項２に記載のヒト免疫不全ウィルス感染阻害物質。

[請求項5] 前記ケモカイン受容体はGXGR4であるとともに、前記阻害物質である前記モノクローナル抗体は抗GXGR4モノクローナル抗体であり、

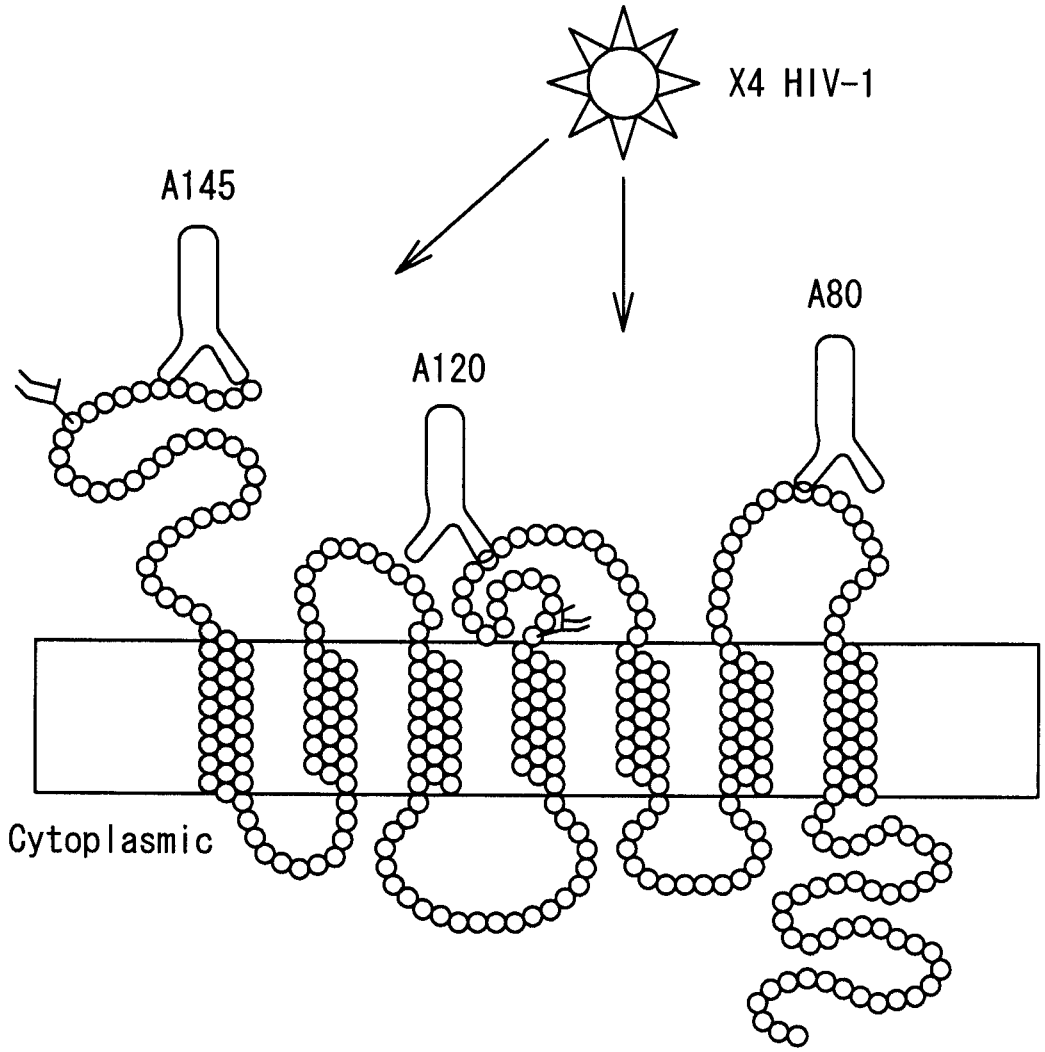
前記抗GXGR4モノクローナル抗体は、前記標的細胞表面より外側へ

突出している前記GXGR4の複数のループドメインのうち、少なくとも第1ループドメイン及び第2ループドメインの一方を有する三次元エピトープを認識する抗体であり、

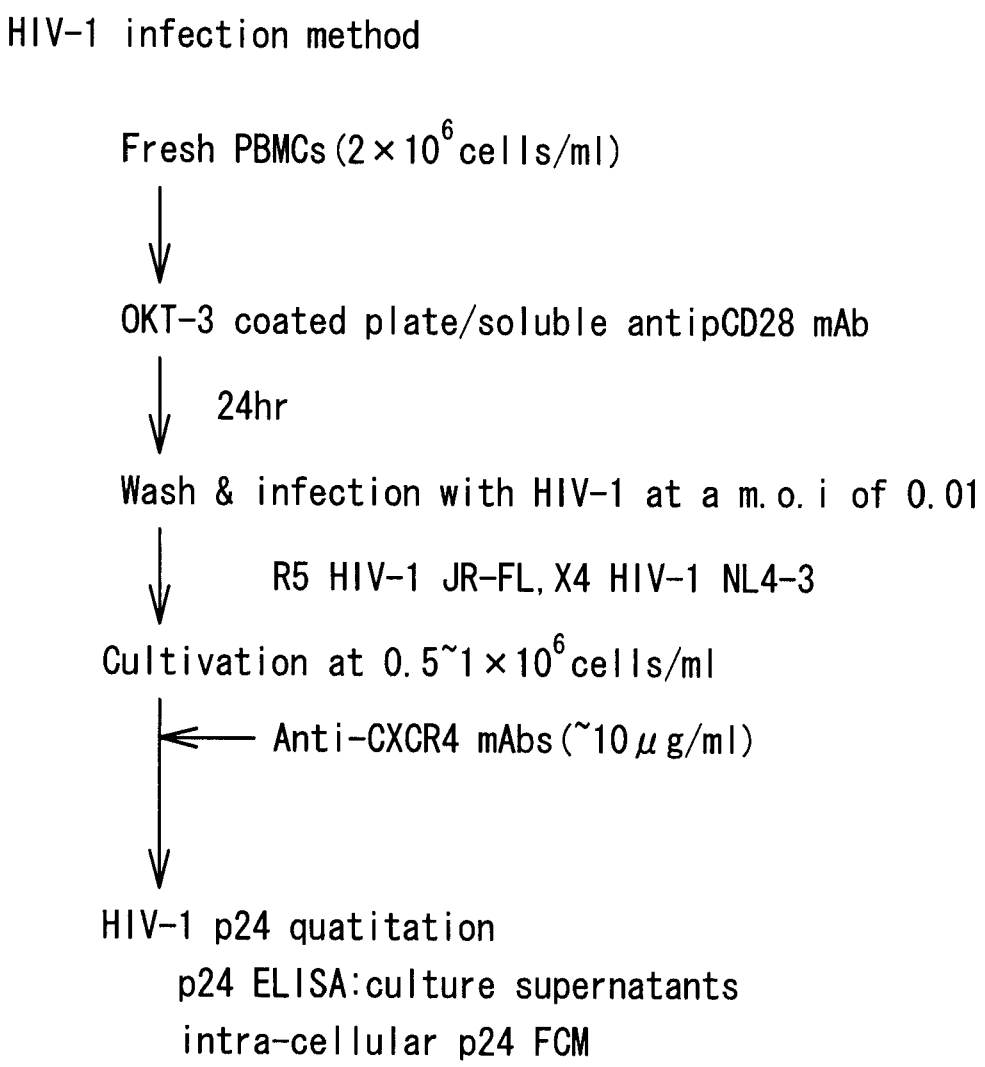
前記抗GXGR4モノクローナル抗体は、前記GXGR4に結合することにより、前記標的細胞に発現するひ-ケモカイン受容体GXGR4を補助受容体として利用するHIV-1 X4ウィルスの前記GXGR4への結合を阻害することにより、前記HIV-1

X4ウィルスの感染を阻止するとともに、前記抗GXGR4モノクローナル抗体の前記GXGR4への結合により誘起されるβ_ケモカインにより、前記標的細胞に発現するβ-ケモカイン受容体GGR5がダウンモデュレーションされた結果、前記β-ケモカイン受容体GGR5を補助受容体として利用するHIV-1 R5ウィルスの感染を阻止することを特徴とする請求項1乃至請求項3いずれか一項に記載のヒト免疫不全ウィルス感染阻害物質。

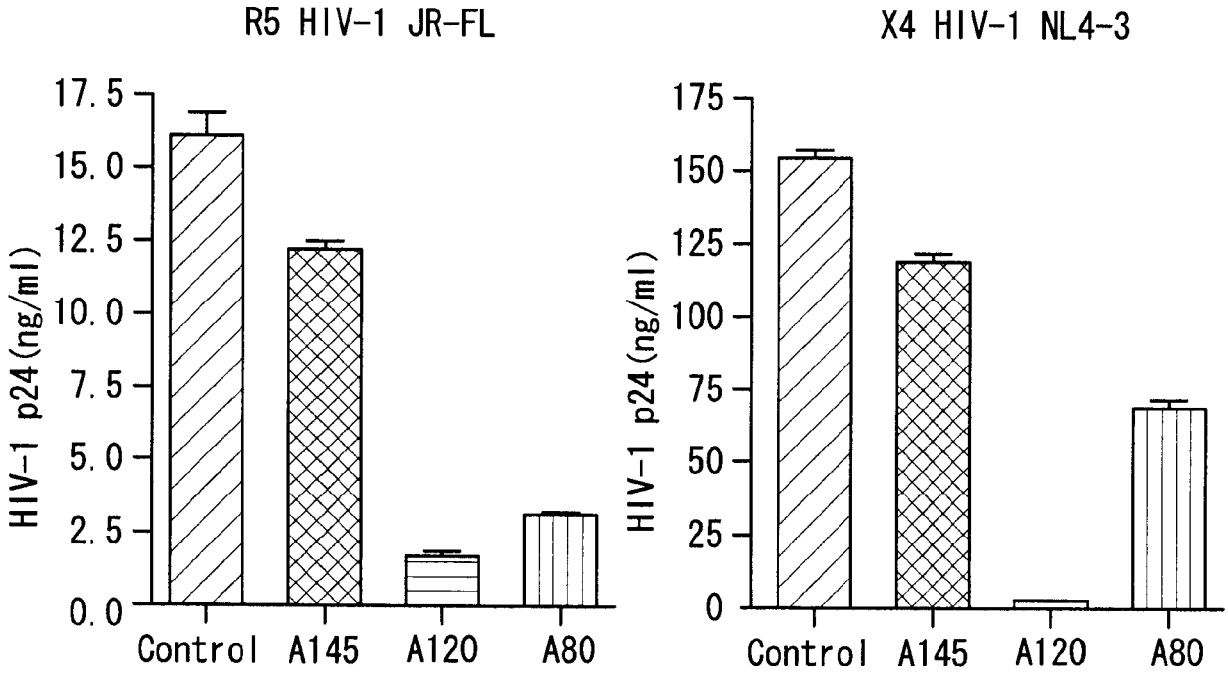
[図1]



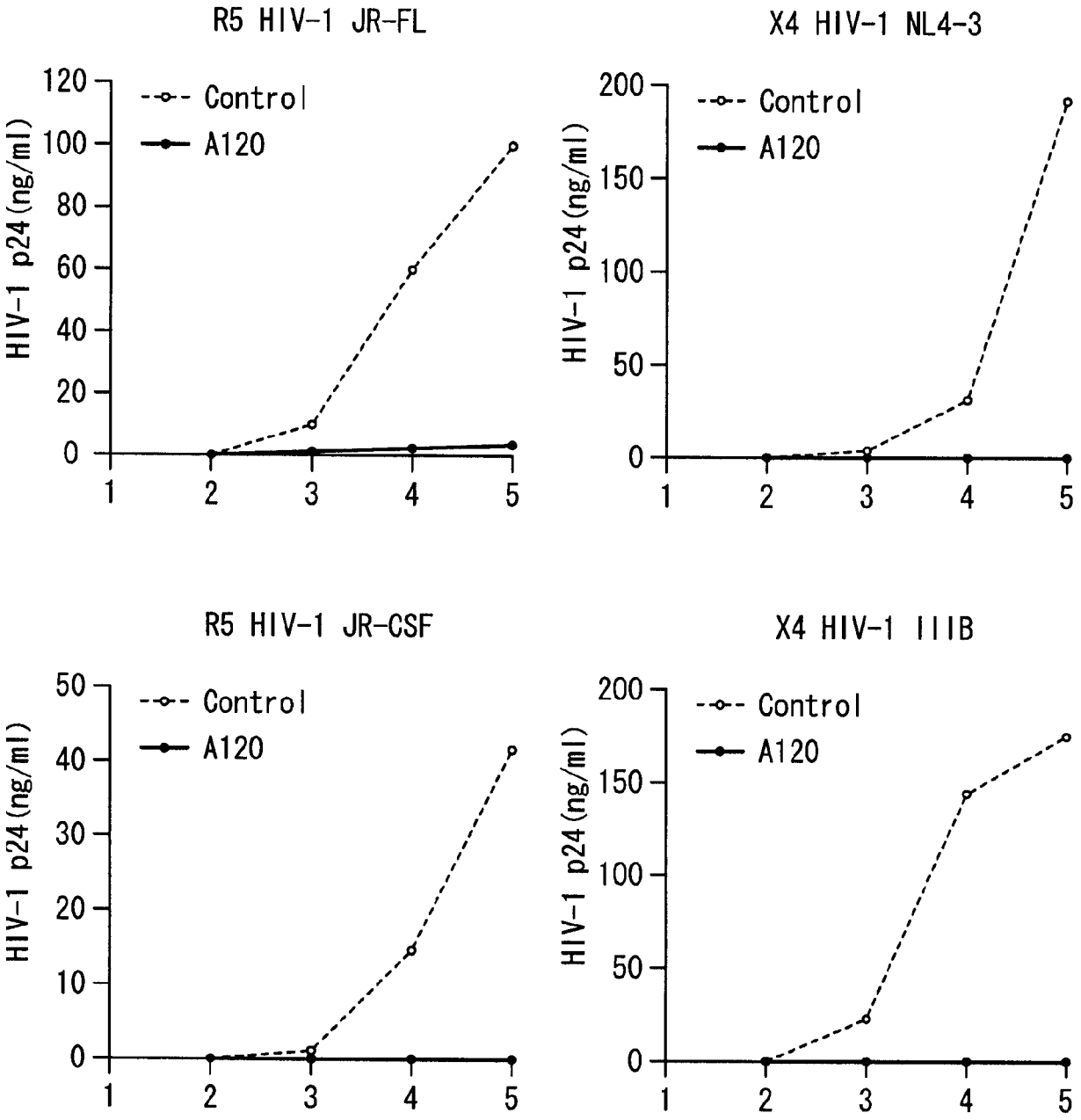
[図2]


HIV-1 infection method
Fresh PBMCs (2×10^6 cells/ml)
OKT-3 coated plate/soluble antipCD28 mAb
24hr
Wash & infection with HIV-1 at a m.o.i of 0.01
R5 HIV-1 JR-FL, X4 HIV-1 NL4-3
Cultivation at 0.5~1×10^6 cells/ml
Anti-CXCR4 mAbs (~10μg/ml)
HIV-1 p24 quatitation
p24 ELISA:culture supernatants
intra-cellular p24 FCM

[図3]

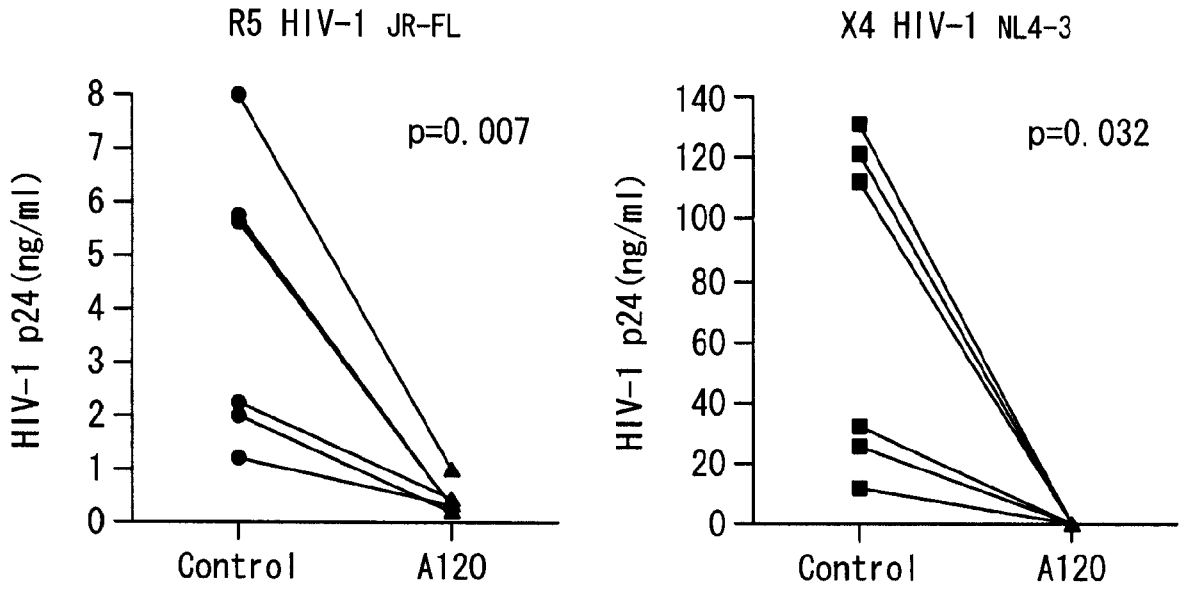

R5 HIV-1 JR-FL
HIV-1 p24(ng/ml)
17.5
15.0
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
Control
A145
A120
A80
X4 HIV-1 NL4-3
HIV-1 p24(ng/ml)
175
150
125
100
75
50
25
0
Control
A145
A120
A80

[図4]

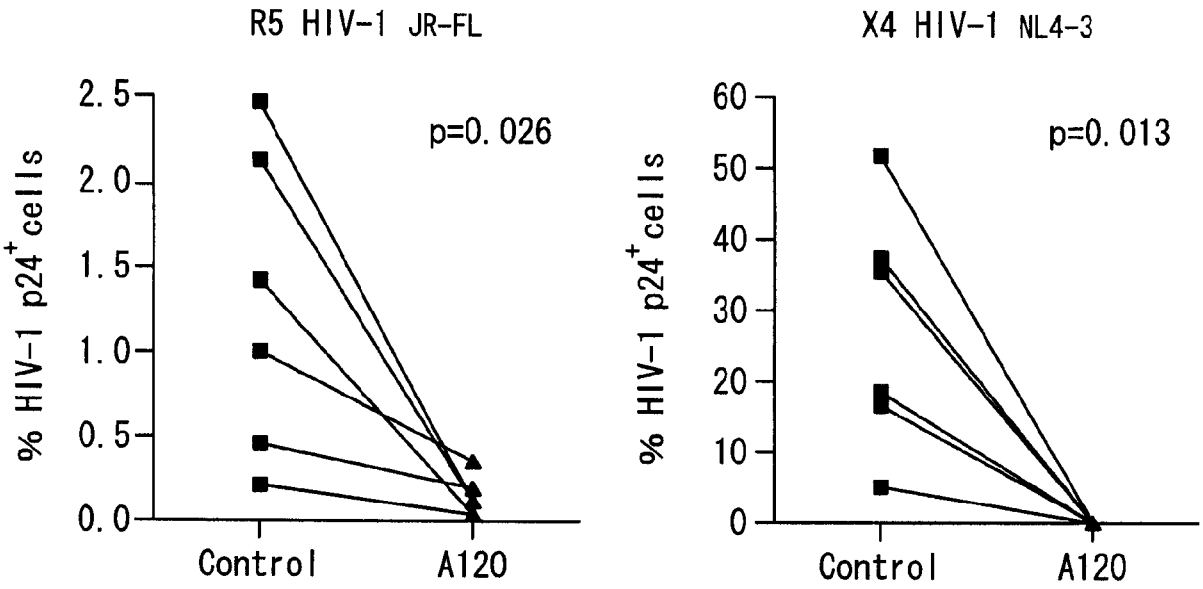

R5 HIV-1 JR-FL
X4 HIV-1 NL4-3
R5 HIV-1 JR-CSF
X4 HIV-1 IIIB
Control
A120
HIV-1 p24(ng/ml)
0
20
40
60
80
100
120
50
150
200
10
30
1
2
3
4
5

[図5]

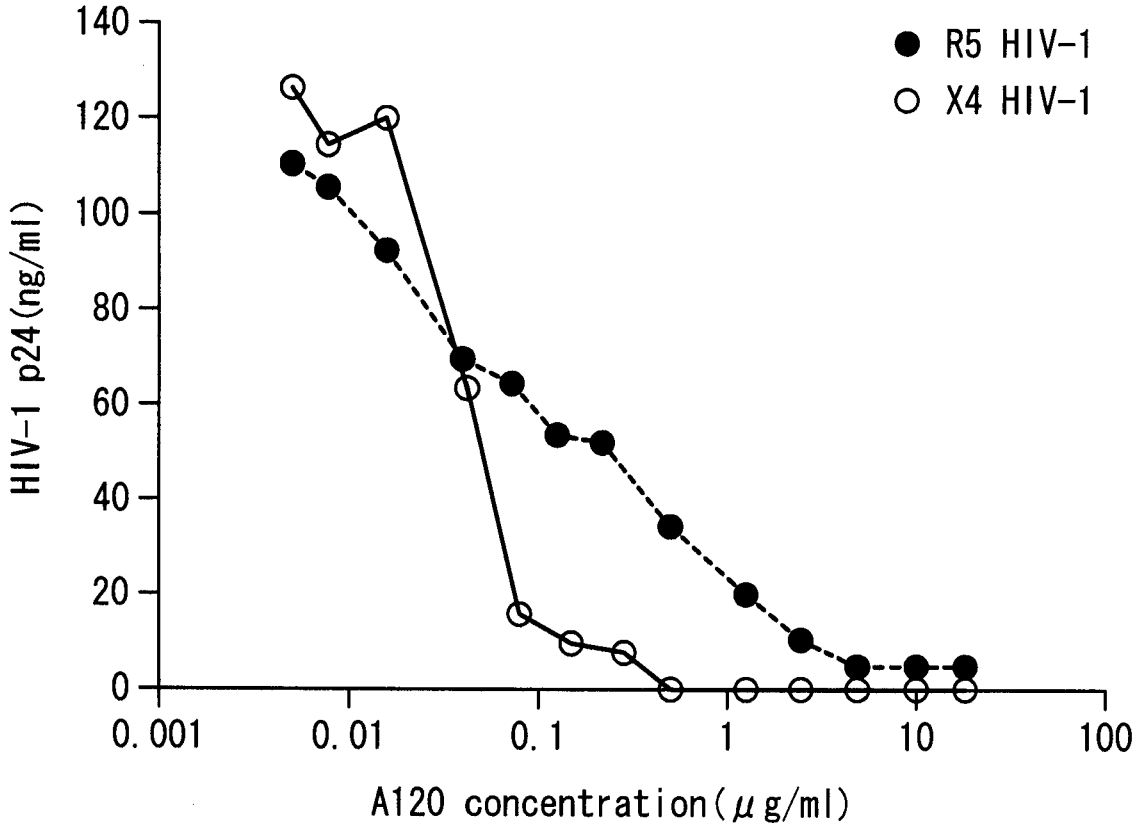
(a) HIV-1 p24 production



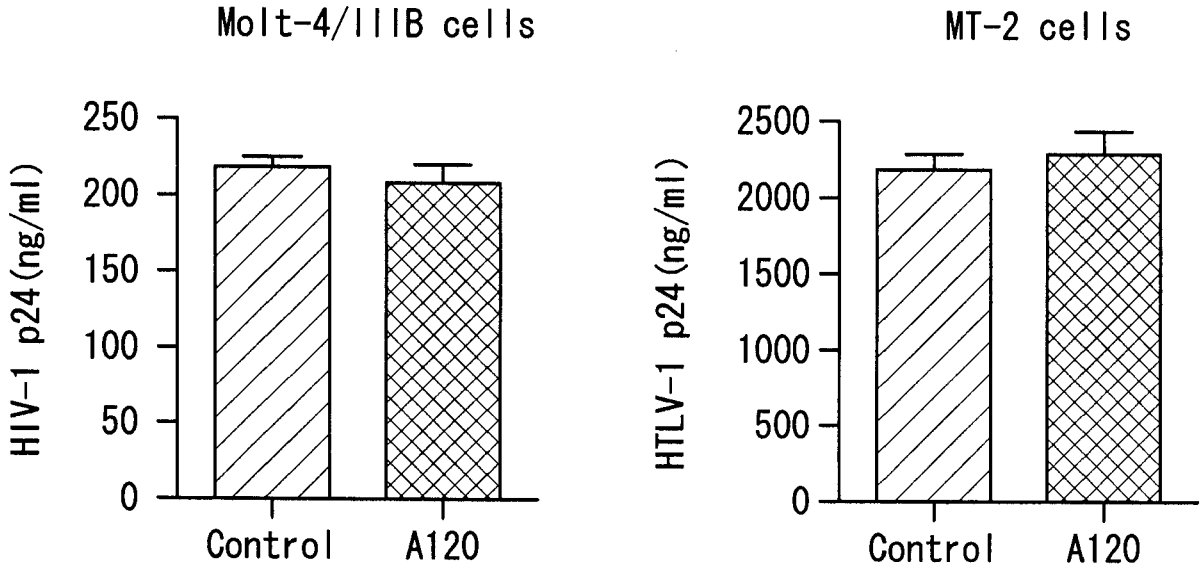
(b) FCM:%infected cells



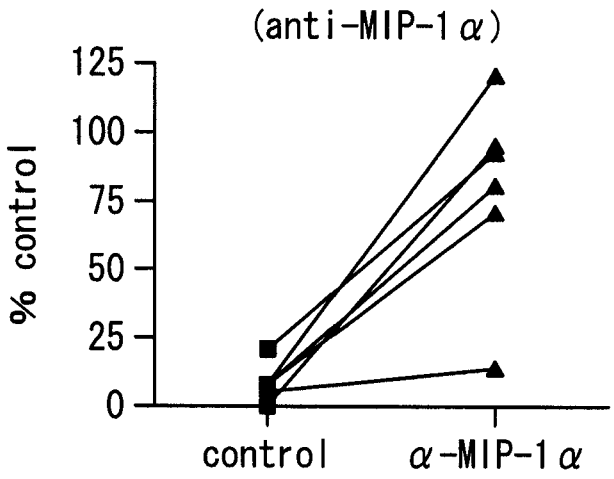
[図6]


R5 HIV-1
X4 HIV-1
HIV-1 p24(ng/ml)
140
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
A120 concentration(μg/ml)

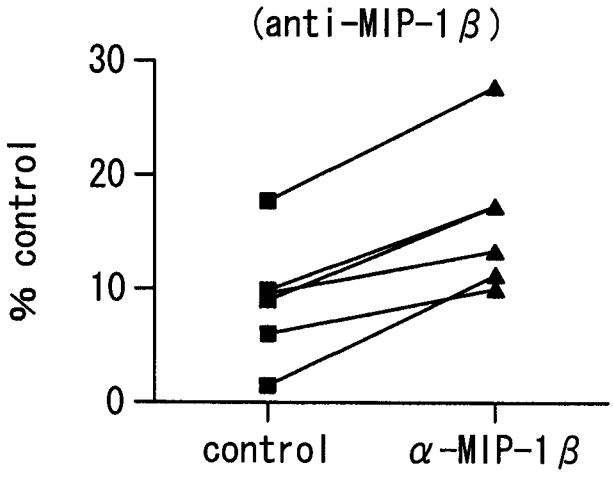
[図7]


Molt-4/IIIB cells
HIV-1 p24(ng/ml)
250
200
150
100
50
0
Control
A120
MT-2 cells
HTLV-1 p24(ng/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
Control
A120

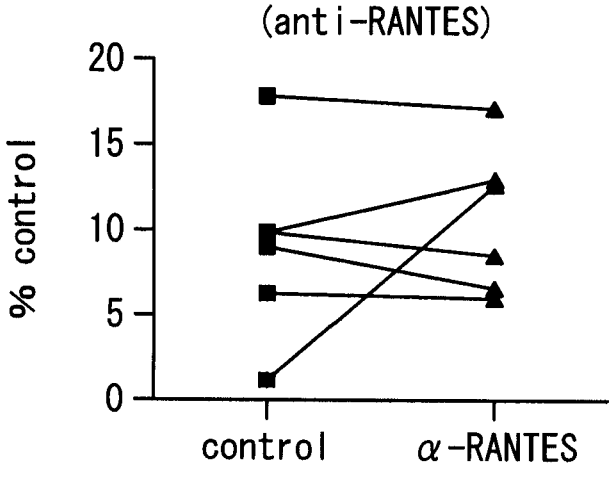
[図8]



p=0.004

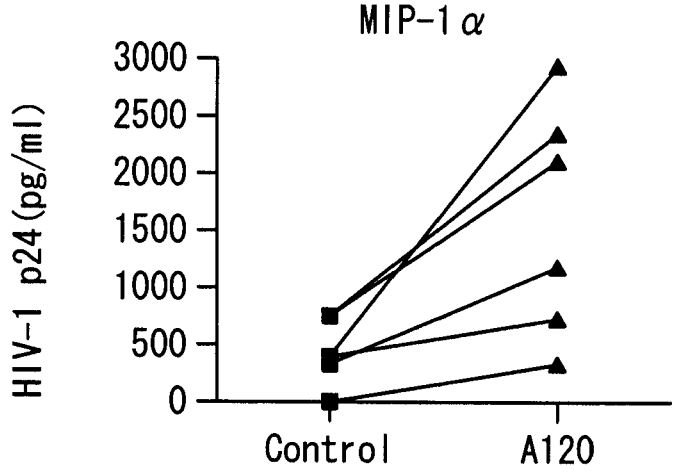


p=0.003

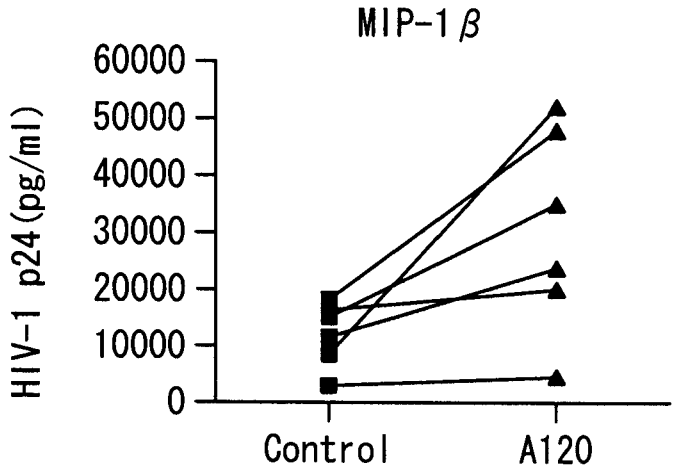


p=0.49

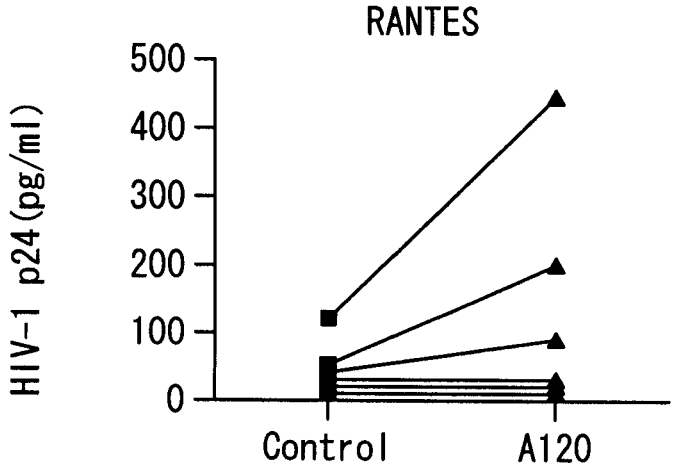
[図9]



p=0.008

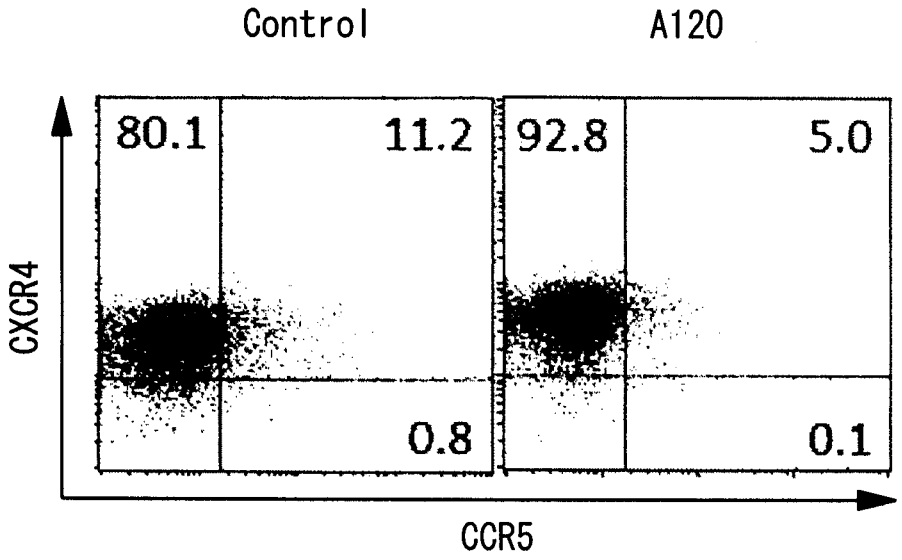


p=0.019



p=0.069

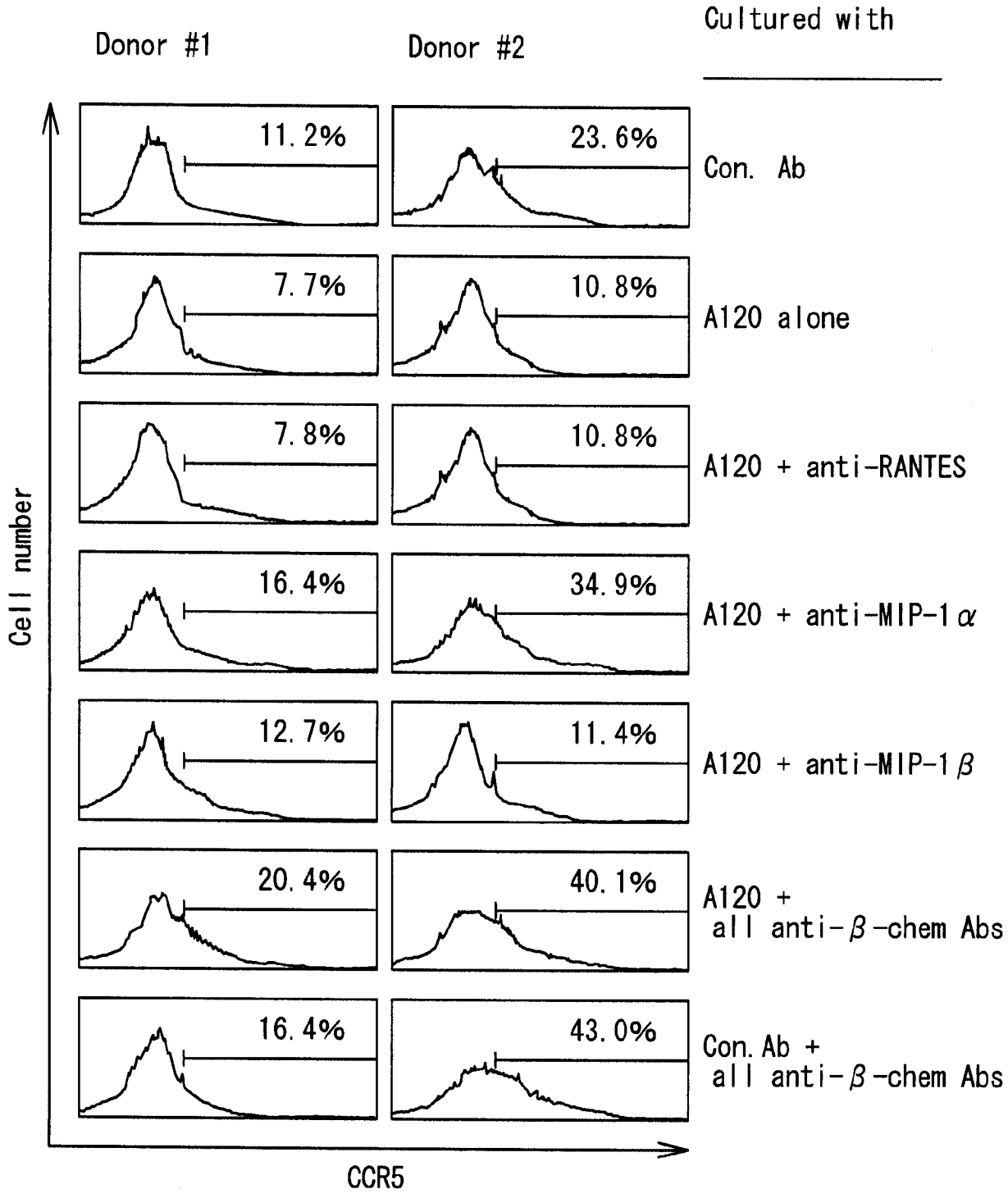
[図10]



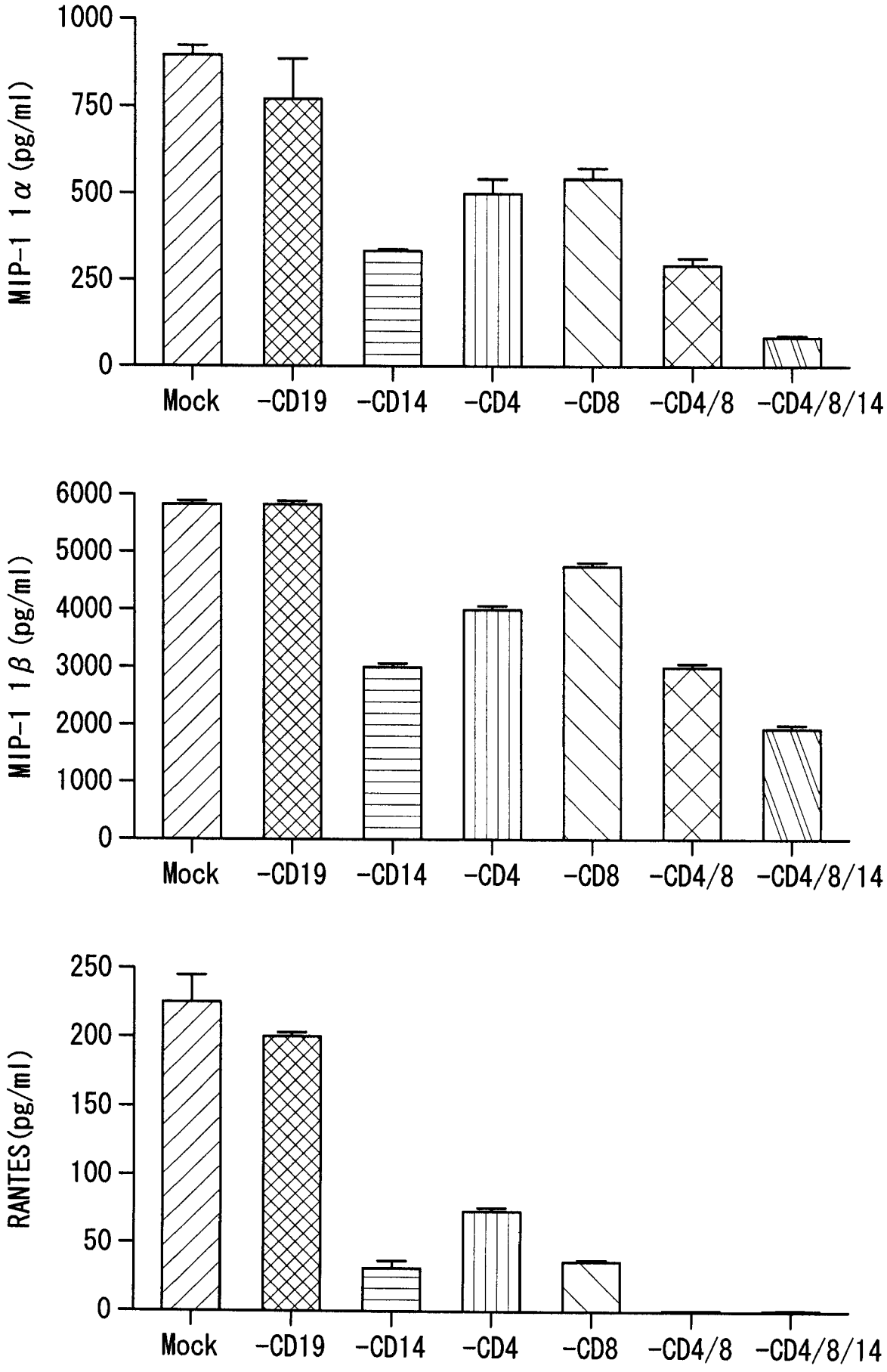
CXCR4 MFI 28.1
CCR5 MFI 60.8

CXCR4 MFI 45.9
CCR5 MFI 51.7

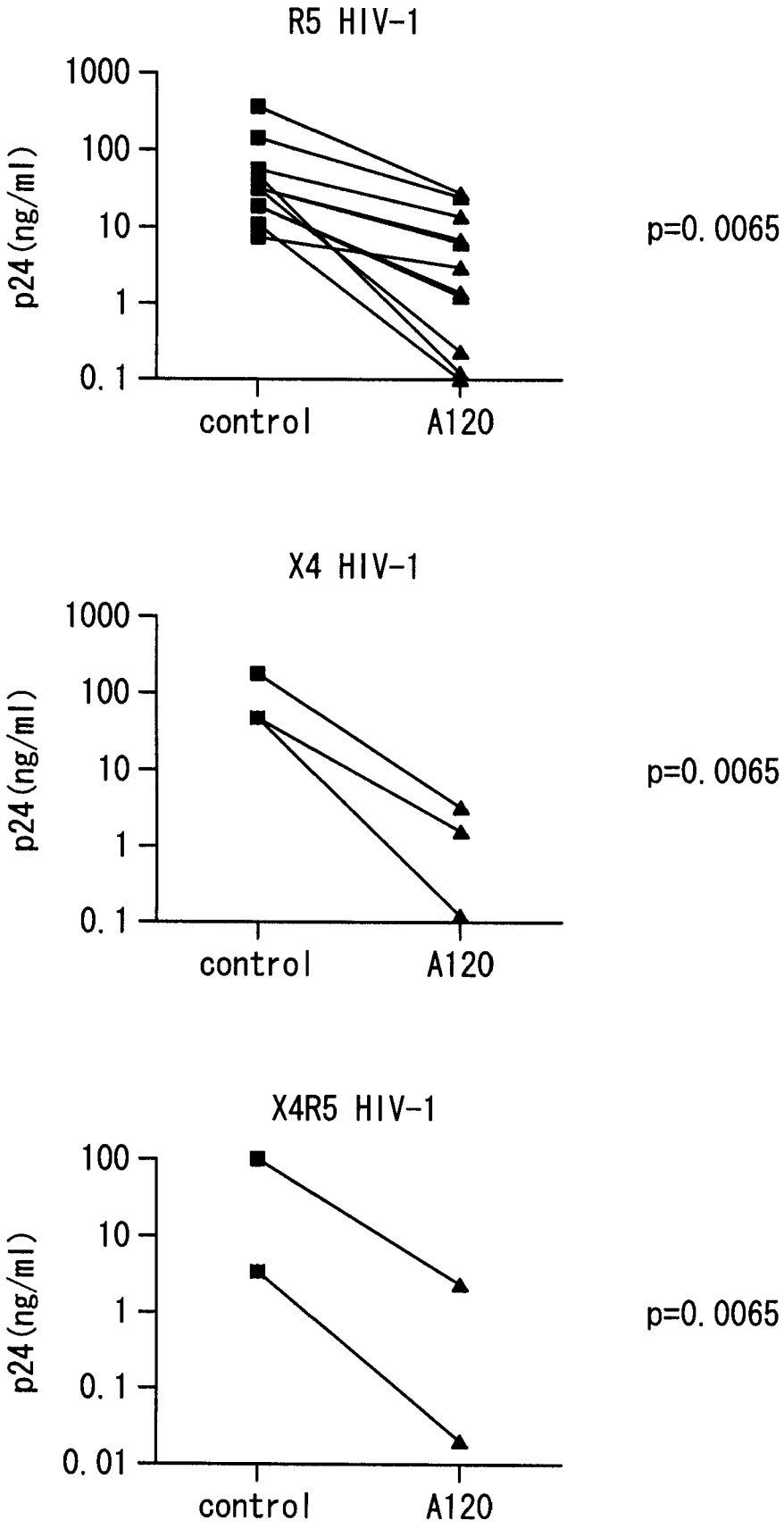
[図11]


Donor #1
Donor #2
Cultured with
11.2%
23.6%
Con. Ab
7.7%
10.8%
A120 alone
7.8%
10.8%
A120 + anti-RANTES
16.4%
34.9%
A120 + anti-MIP-1α
12.7%
11.4%
A120 + anti-MIP-1β
20.4%
40.1%
A120 + all anti-β-chem Abs
16.4%
43.0%
Con. Ab + all anti-β-chem Abs
Cell number
CCR5

[図12]

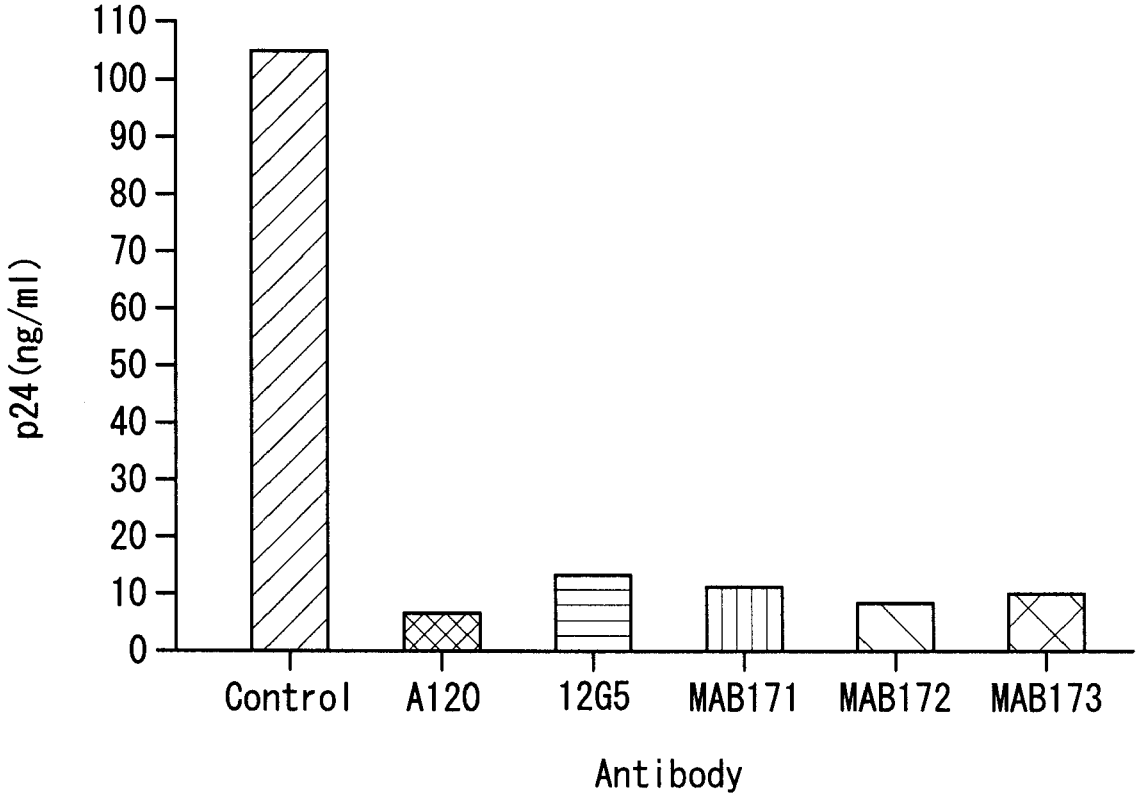

MIP-1 1α (pg/ml)
1000
750
500
250
0
Mock
-CD19
-CD14
-CD4
-CD8
-CD4/8
-CD4/8/14
MIP-1 1β (pg/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Mock
-CD19
-CD14
-CD4
-CD8
-CD4/8
-CD4/8/14
RANTES(pg/ml)
250
200
150
100
50
0
Mock
-CD19
-CD14
-CD4
-CD8
-CD4/8
-CD4/8/14

[図13]

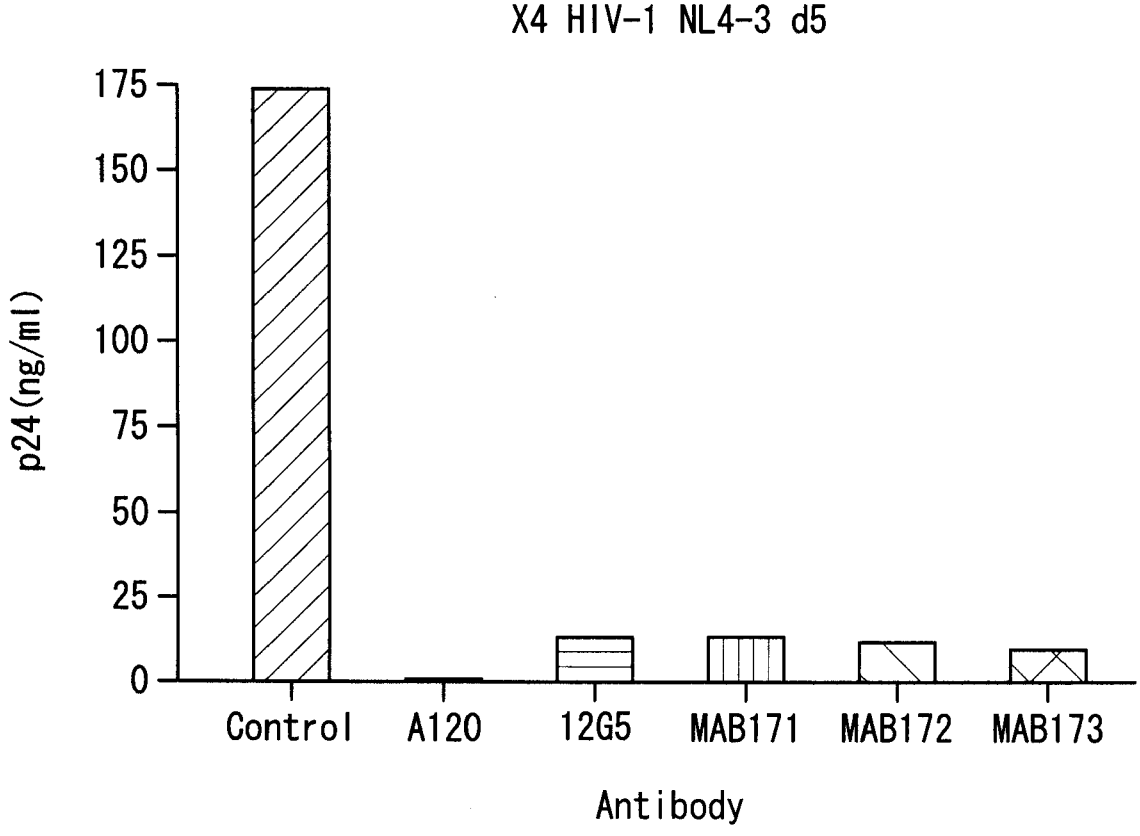

R5 HIV-1
1000
100
10
1
0.1
p24(ng/ml)
control
A120
p=0.0065
X4 HIV-1
1000
100
10
1
0.1
p24(ng/ml)
control
A120
p=0.0065
X4R5 HIV-1
100
10
1
0.1
0.01
p24(ng/ml)
control
A120
p=0.0065

[図14]

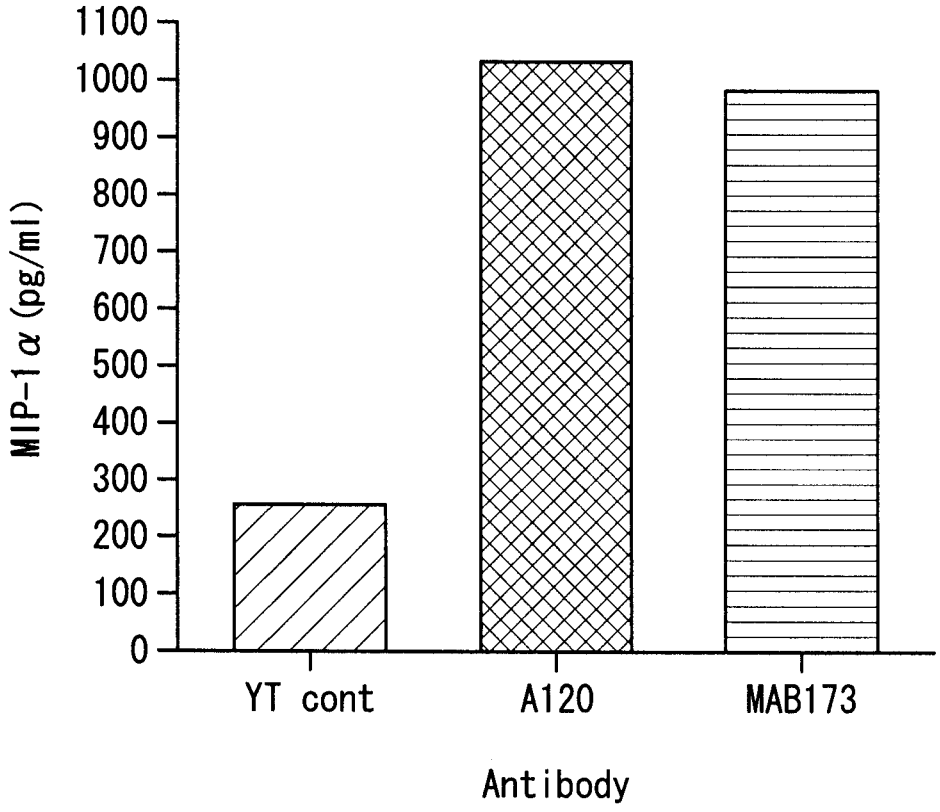
(a)


R5 HIV-1 JR-FL d5
p24(ng/ml)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Control
A120
12G5
MAB171
MAB172
MAB173
Antibody

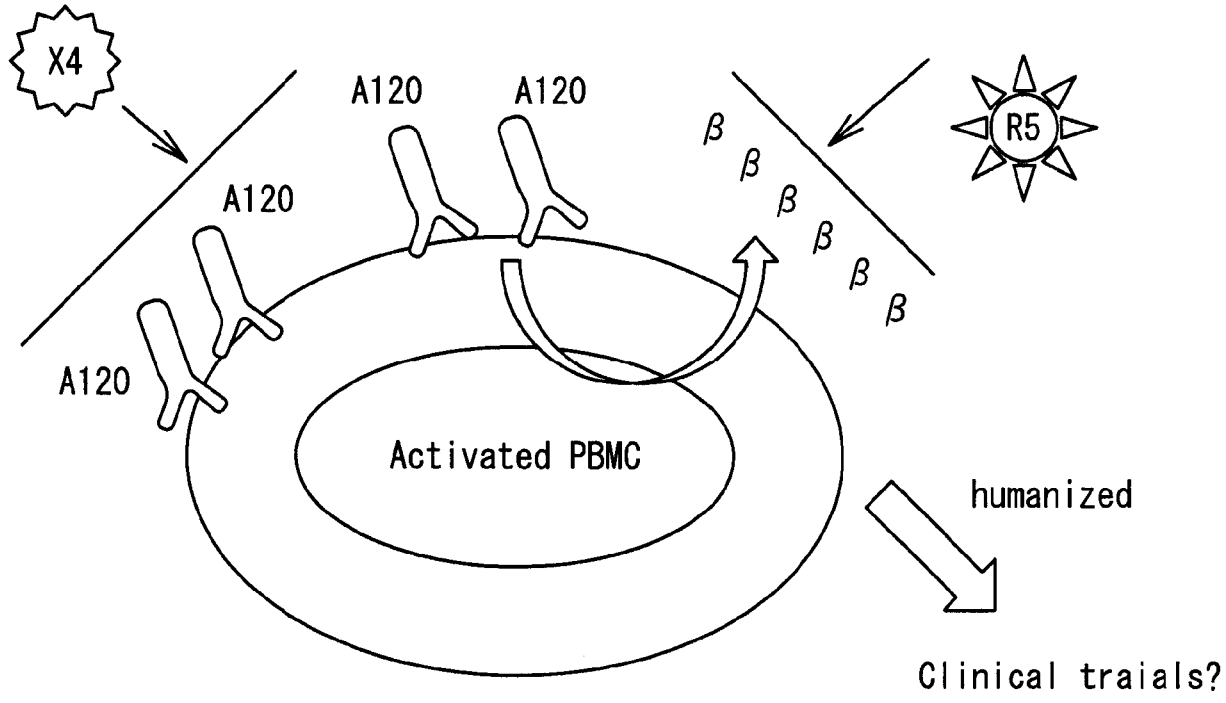
(b)


X4 HIV-1 NL4-3 d5
p24(ng/ml)
175
150
125
100
75
50
25
0
Control
A120
12G5
MAB171
MAB172
MAB173
Antibody

[図15]


1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
MIP-1α (pg/ml)
YT cont
A120
MAB173
Antibody

[図16]


X4
A120
A120
A120
A120
β
β
β
β
β
β
R5
Activated PBMC
humanized
Clinical traials?

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT / JP2 011 / 062007

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K1 6/28 (2006.01)i, C12P21 / 08 (2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K16/28, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/ BIOSIS/MEDLINE /WPI DS (STN), JST Plus / JMEDPlus / JST 7580 (JDreaml l)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X / Y	TANAKA, R., et al., Unique monoclonal antibody recognizing the third extracellular loop of CXCR4 induces lymphocyte aggluti nation and enhances human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation and productive infection., J. Virol., 2001.12, Vol.75, No.23, p.11534-11543	1-5 / 1-5
X / Y	CARNEC, X., et al., Anti-CXCR4 monoclonal antibodies recognizing overlapping epitopes differ significantly in their ability to inhibit entry of human immunodeficiency virus type 1., J. Virol., 2005.02, Vol.79, No.3, p.1930-1933	1-5 / 1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibnion or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying tiie invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 August, 2011 (02.08.11)	09 August, 2011 (09.08.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT / JP2 011/ 062007

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yuet su TANAKA, "HIV Kans en Zosho ku o Yokus ei suru Futat su no Hoho : Jujo Saibo Vacci ne to 0X40 Shigeki ", The Journal of AIDS Research, 20 November 2010 (20.11.2010), vol .12, no.4, page 305, SY10-1)	1-5

国際調査報告

国際出願番号 PCT／JP2011/062007

A． 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C07K16/28 (2006.01)i，C12P21/08 (2006.01)n

B． 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C07K16/28, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922—1996年
日本国公開実用新案公報 1971—2011年
日本国実用新案登録公報 1996—2011年
日本国登録実用新案公報 1994—2011年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)，JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C． 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X/Y	TANAKA, R., et al., Unique monoclonal antibody recognizing the third extracellular loop of CXCR4 induces lymphocyte agglutination and enhances human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation and productive infection., J. Virol., 2001.12, Vol.75, No.23, p.11534-11543	1-5/1-5
X/Y	CARNEC, X., et al., Anti-CXCR4 monoclonal antibodies recognizing overlapping epitopes differ significantly in their ability to mnibit entry of human immunodeficiency virus type 1., J. Virol., 2005.02, Vol.79, No.3,	1-5/1-5

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
02.08.2011	09.08.2011

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	4B	4867
日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100—8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	長谷川 茜 電話番号 03—3581—1101 内線 3448		

様式PCT／ISA／210（第2ページ）（2009年7月）

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
	p.1930-1933	
A	田中勇悦，HIV 感染増殖を抑制する二つの方法:樹状細胞ワクチンと 0X40 刺激，日本エイズ学会誌，2010. 11. 20，Vol. 12，No. 4，p. 305，SY10- 1)	１－５